

Requested Patent EP0894870A2

Title: EXTRACTION OF FUNGAL CELLS FROM CLINICAL MATERIAL ;

Abstracted Patent: EP0894870 ;

Publication Date: 1999-02-03 ;

Inventor(s): EINSELE HERMANN DR (DE) ;

Applicant(s): UNIV EBERHARD KARLS (DE) ;

Application Number: EP19980103296 19960813 ;

Priority Number(s):

DE19951030332 19950817; DE19951030333 19950817; DE19951030336
19950817; EP19960929253 19960813 ;

IPC Classification: C12Q1/68 ;

Equivalents:

ABSTRACT:

Detecting fungal cells in clinical material, comprises extracting fungal DNA from whole blood and detecting the extracted fungal DNA, and/or identifying the fungal species from the extracted DNA. Also claimed is identifying a fungal species, comprising preparing a test soln. contg. at least segments of the DNA of the species to be identified, and detecting nucleotide sequences characteristic of the species in the soln.. Also claimed are the oligonucleotide probes (I)-(VI), TCTGGGTAGC CATTATGGC GAACCAGGAC (I), TTCTGGCTAA CCCCAAGTCC TTGTGGCTTG (II), GTCTTTCTT CTGGCTAGCC TCGGGCGAAC (III), GTTGGCCGGT CCATCTTCT GATGCGTACT (IV), TTTCCCTTCTG GCTAGCCTTT TTGGCGAAC (V), and CATGGCCTTC ACTGGCTGTG GGGGAACCA (VI).



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 894 870 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
03.02.1999 Patentblatt 1999/05

(51) Int. Cl. 5: C12Q 1/68

(21) Anmeldenummer: 98103296.4

(22) Anmeldetag: 13.08.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FI FR GB IT LI NL SE

(72) Erfinder: Einsele, Hermann, Dr.
72076 Tübingen (DE)

(30) Priorität: 17.08.1995 DE 19530332
17.08.1995 DE 19530333
17.08.1995 DE 19530336

(74) Vertreter: Otten, Hajo, Dr.-Ing.
Witte, Weller, Gahlert, Otten & Steil,
Patentanwälte,
Rotebühlstrasse 121
70178 Stuttgart (DE)

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)
nach Art. 76 EPÜ:
96929253.1 / 0 846 186

Bemerkungen:
Der Anmelder hat nachträglich ein Sequenzprotokoll
eingereicht und erklärt, dass dieses keine neuen
Angaben enthält.

(71) Anmelder:
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Universitätsklinikum
72076 Tübingen (DE)

(54) Extraktion von Pilzzellen-DNA aus klinischem Material

(57) Zum Nachweisen von Pilzzellen in klinischem Material wird Pilz-DNA aus Vollblut extrahiert. Das Verfahren zum Extrahieren der Pilz-DNA aus Vollblut umfasst dabei die Isolation überwiegend intakter Pilzzellen aus dem Vollblut und die Extraktion von DNA aus den isolierten Pilzzellen.

EP 0 894 870 A2

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein ein Verfahren zum Nachweisen von Pilzzellen in klinischem Material unter Extrahieren von Pilz-DNA aus Vollblut mit den Schritten:

5 a) Isolation überwiegend intakter Pilzzellen aus dem Vollblut, und
 b) Extrahieren von DNA aus den isolierten Pilzzellen durch
 b1) Aufschließen der isolierten Pilzzellen, und
 b2) Isolation der Pilz-DNA.

10 [0002] Ein derartiges Verfahren ist aus der WO 93/23568 bekannt.

[0003] Verfahren zum Nachweisen von Pilzzellen in klinischem Material sind außerdem aus der Praxis bekannt, sie beruhen standardmäßig auf einer Anzüchtung von Pilzspezies aus klinischem Material auf entsprechenden Nährmedien.

15 [0004] Durch diese Anzüchtung z.B. in Petrischalen und den Nachweis anhand der gewachsenen oder auch nicht gewachsenen Kolonien sind die Nachweigeschwindigkeit sowie -empfindlichkeit insbesondere wegen des langsamen Wachstumes der Pilzspezies stark beeinträchtigt. Die Diagnose der invasiven Pilzinfektion wird daher häufig erst durch eine äußerst komplikationsträchtige Biopsie eines Organes oder sogar erst nach dem Tod des Patienten gestellt.

20 [0005] Das Interesse an Verfahren zum Nachweisen von Pilzzellen ist vor dem Hintergrund zu sehen, daß insbesondere in den letzten Jahren Pilzspezies als bedeutende nosokomiale Pathogene eine erhebliche Bedeutung für immunsupprimierte Patienten erlangt haben. Vor allem nach Knochenmarktransplantationen (KMT), aber auch nach Leber-, Nieren-, Pankreas-, Herz- und Herz-Lungen-Transplantationen haben invasive Pilzinfektionen erheblich zugenommen. So ist es z.B. im Jahr 1994 vor allem in französischen KMT-Zentren zu einer solchen Häufung vor allem von Aspergillusinfektionen gekommen, daß diese Zentren mehrere Monate geschlossen werden mußten.

25 [0006] Neben den organtransplantierten Patienten sind aber auch Patienten mit Krebserkrankung, vor allem nach Chemotherapie oder chirurgischen Eingriffen, Verbrennungspatienten sowie Patienten auf chirurgischen und neonatalen Intensivstationen zunehmend von invasiven Pilzinfektionen betroffen. Sobald es bei diesen Patientenkollektiven zu einer Beteiligung eines Organsystems oder gar mehrerer Organsysteme kommt, beträgt die Sterblichkeit an dieser infektiösen Komplikation zwischen 80 und 100 %.

30 [0007] Nur durch eine frühzeitige Diagnose kann hier der Behandlungserfolg verbessert werden. Wegen der mit den eingangs erwähnten Standardnachweisverfahren verbundenen Nachteile werden intensive Bemühungen unternommen, eine frühzeitige Sicherung der Diagnose einer systemischen Pilzinfektion zu ermöglichen.

[0008] Ein auf molekularbiologischen Techniken beruhendes Verfahren zum Nachweis und zur Differenzierung pathogener Pilzspezies in klinischem Material ist in der eingangs genannten WO 93/23568 beschrieben. In diesem Verfahren werden Pilzzellen aus Patientenblut isoliert, wobei die Pilzzellen zuerst von dem übrigen Blutmaterial abgetrennt werden. Danach wird die Pilzellwand aufgebrochen und die Pilz-DNA isoliert. Daraus wird dann ein Segment aus dem 5S rRNA-Gen in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und mit verschiedenen Methoden nachgewiesen. Anhand der isolierten DNA können außerdem verschiedene Pilzspezies voneinander unterschieden werden.

35 [0009] Die wesentlichen Probleme des Nachweises von Pilzinfektionen mit Hilfe molekularbiologischer Techniken sind dabei auf die sehr komplexe Zusammensetzung der Pilzellenwand zurückzuführen, die bisher zeitaufwendige aber auch teure Extraktionsverfahren erforderlich machen.

40 [0010] Ein weiteres Problem besteht darin, daß eine zunehmende Zahl von Pilzspezies bei den immunsupprimierten Patienten bedrohliche Infektionen auslösen kann, woraus die Notwendigkeit resultiert, eine Fülle von verschiedenen Pilzgattungen und -stämmen bei diesen Patienten erfassen und bestimmen zu müssen. Da sich die Therapie der Infektionen bei verschiedenen Pilzspezies nämlich unterscheidet, ist es folglich erforderlich, nicht nur alle Pilzspezies erfassen, sondern diese auch differenzieren und identifizieren zu können.

45 [0011] Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, das eingangs erwähnte Verfahren dahingehend weiterzubilden, daß eine frühzeitige Diagnose einer Pilzinfektion möglich wird.

[0012] Das Verfahren soll dabei möglichst schnell und einfach durchzuführen sein, möglichst viele Pilzspezies erfassen und in einer Weiterbildung auch identifizieren können.

50 [0013] Diese Aufgabe wird bei einem Verfahren der eingangs genannten Art dadurch gelöst, daß der Schritt a) die weiteren Schritte umfaßt:

55 a1) Aufschließen der im Vollblut befindlichen Blutzellen; und
 a2) Isolation überwiegend intakter Pilzzellen von zellulärer DNA.

[0014] Bei den einzelnen Schritten des neuen Verfahrens waren viele Probleme zu überwinden, die sich zum Teil aus

der Zusammensetzung der Pilzzellenwand und aus der Tatsache ergaben, daß ein Großteil der Pilzzellen sich nicht im Vollblut frei in Lösung sondern nach Phagozytose in verschiedenen Blutzellpopulationen befindet, vor allem in Granulozyten und Makrophagen.

5 [0015] Das erfindungsgemäße Verfahren wird zwar vorteilhaft in der Diagnostik eingesetzt, um eine Pilzinfektion bei einem Patienten nachweisen zu können, es findet aber auch dort Anwendung, wo Pilz-DNA für anderweitige Weiterverarbeitung benötigt wird.

10 [0016] Mit dem neuen Verfahren kann dafür z. B. Pilz-DNA aus dem Blut von Tieren gewonnen werden, die speziell mit den interessierenden Pilzspezies infiziert wurden. Aus der so gewonnenen Pilz-DNA können z. B. DNA-Sonden herausgeschnitten werden, die für Nachweisreaktionen verwendet oder in Plasmide eingebaut werden können. Es sind dabei Anwendungen im ganzen Bereich der Grundlagenforschung, Diagnostik, Therapeutik, industriellen Gentechnologie etc. denkbar.

15 [0017] Das Verfahren der Extraktion von Pilz-DNA erlaubt es, insbesondere in der Diagnostik auch bei sehr geringen Mengen von Pilzen in dem vorliegenden Vollblut noch zuverlässig Pilz-DNA extrahieren zu können. Ferner kann dieser Verfahrensschnitt schnell und so einfach durchgeführt werden, daß er auch im Klinikalltag und ggf. von angelerntem Personal angewendet werden kann.

20 [0018] Das neue Verfahren besteht sozusagen aus zwei Stufen, wobei in der ersten Stufe Pilzzellen aus dem Vollblut isoliert werden und dann in der zweiten Stufe die DNA aus diesen isolierten Pilzzellen extrahiert wird, um mit Hilfe dieser extrahierten DNA dann Pilzinfektionen nachweisen und ggf. spezifizieren zu können. Dieses zweistufige Verfahren erhöht vor allem die Spezifität, da ggf. störende, anderweitige DNA in dem zweiten Verfahrensschritt nur noch in geringem Maße vorhanden ist.

25 [0019] Außerdem wird eine sehr schnelle und sichere Trennung der Pilz-DNA von zellulärer DNA erreicht. Durch den Aufschluß der im Vollblut befindlichen Blutzellen wird nämlich in dieser Ausgangslösung die zelluläre DNA freigesetzt, woraufhin dann die durch das bisherige Aufschlußverfahren noch nicht oder zumindest noch nicht vollständig aufgeschlossenen Pilzzellen durch schnelle und einfache Verfahren, wie z.B. eine Zentrifugation von der freien zellulären DNA getrennt werden können. Bei dem daraufhin folgenden Aufschließen der so isolierten Pilzzellen kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, daß sich keine oder nur noch unerhebliche Mengen an zellulärer DNA in der Lösung befindet. Das im Schritt a1) durchzuführende Aufschließen der Blutzellen muß folglich so erfolgen, daß die Pilzzellen noch nicht lysiert werden. Da die Pilzzellwand deutlich komplexer ist als die Zellwand von Blutzellen, kann dies durch geeignete vorsichtige Aufschlußverfahren sichergestellt werden.

30 [0020] Der Verfahrensschritt a1) hat jedoch noch einen weiteren Vorteil, durch ihn werden nämlich ggf. phagozytierte Pilzzellen wieder freigesetzt, so daß insbesondere für die Diagnostik auch noch sehr geringe Mengen von Pilzen in dem vorliegenden Vollblut extrahiert werden können. Bei dem neuen Verfahren ist es nämlich nicht mehr erforderlich, daß zumindest einige Pilzzellen in dem Vollblut frei in Lösung sind, es reicht völlig aus, wenn einige wenige Pilzzellen nach Phagozytose z.B. in Granulozyten oder Makrophagen vorliegen.

35 [0021] Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst.
 [0022] Dabei ist es insbesondere bevorzugt, wenn im Schritt a) folgende Schritte durchgeführt werden:

a1.1) Lysis der roten Blutkörperchen durch osmotische Hämolyse;

40 a1.2) enzymatisches Aufschließen der weißen Blutkörperchen; und

a2.1) Zentrifugation des so behandelten Vollblutes und Verwendung des Pellet in den nächsten Verfahrensschritten.

45 [0023] Hier ist von Vorteil, daß in den Schritten a1.1) und a1.2) zwar zuverlässig die Blutzellen aufgeschlossen werden, die Pilzzellen selbst jedoch noch nicht beschädigt sind. Durch die folgende Zentrifugation ist dann eine sehr sichere Trennung zwischen der inzwischen freigesetzten zellulären DNA der Blutzellen und Zellbruchstücken der Blutzellen einerseits sowie noch überwiegend intakten Pilzzellen andererseits möglich. Auf diese Weise wird außerdem sichergestellt, daß keine Pilz-DNA verlorengeht, da diese noch in den im Pellet zu findenden Pilzzellen vorhanden ist.

50 Zusammengefaßt liegen die Vorteile der obigen Schritte also darin, daß zum einen auch geringste Konzentrationen von Pilzzellen erfaßt werden und daß zum anderen die isolierte Pilz-DNA allenfalls gering mit zellulärer DNA verunreinigt ist, so daß eine hohe Sensitivität und Spezifität bei den nachfolgenden diagnostischen Schritten möglich ist, da das ist, so daß eine hohe Sensitivität und Spezifität bei den nachfolgenden diagnostischen Schritten möglich ist, da das Verhältnis von Pilz- zu zellulärer DNA zugunsten der Pilz-DNA deutlich verbessert wurde.

55 [0024] In einer Weiterbildung ist es dann bevorzugt, wenn im Schritt b) folgende Schritte durchgeführt werden:

b1.1) alkalisches Lysieren und enzymatische Behandlung der Pilzzellen.

[0025] Es hat sich herausgestellt, daß durch diese einfachen Verfahrensschritte ein sicheres Aufschließen der Pilz-

zellen möglich ist, die aus dem Pellet des Verfahrensschrittes a2.1) wieder aufgenommen wurden.

[0026] Weiterhin ist es bevorzugt, wenn im Schritt a1.1) die Lysis der roten Blutkörperchen mit Hilfe einer hypotonen Lösung erfolgt, vorzugsweise mit einer Endkonzentration von ca. 10 mM Tris pH 7,6, 5 mM MgCl₂ und 10 mM NaCl, und wenn im Schritt a1.2) das enzymatische Aufschließen der weißen Blutkörperchen in einer Lösung mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml Proteinase K, 10 mM Tris pH 7,6, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl und 0,2 % SDS erfolgt.

[0027] In einer Weiterbildung wird die Lösung aus Schritt a1.2) für 100-140 min, vorzugsweise 120 min bei 60-70 C, vorzugsweise bei 65 C inkubiert.

[0028] Es wurde gefunden, daß auf diese Weise die Blutzellen zuverlässig und vollständig aufgeschlossen werden können, wobei eine Beschädigung der Pilzzellen vermieden wird, so daß nach diesen Verfahrensschritten sowohl die in dem Ausgangsblut frei in Lösung befindlichen als auch die phagozytierten Pilzzellen relativ unbeschädigt vorliegen und abzentrifugiert werden können, ohne ihre DNA dabei zu verlieren.

[0029] Ferner ist es bevorzugt, wenn der Schritt b1.1) die folgenden Schritte umfaßt:

15 - Inkubieren der im Pellet aus Schritt a2.1) befindlichen Pilzzellen bei 90-98°C, vorzugsweise 95°C für 5-15 min, vorzugsweise 10 min, in einer Lösung mit 50 mM NaOH,
 - Neutralisation mit 1 M Tris-HCl pH 7,0,
 - Enzymatische Behandlung mit Zymolyase für 50-70 min, vorzugsweise 60 min bei 30-40°C, vorzugsweise 37°C,
 - Proteindenaturierung durch Inkubation mit Tris/EDTA bei 60-70°C, vorzugsweise 65°C, für 10-30 min, vorzugsweise 20 min.

[0030] Es wurde gefunden, daß durch diese Verfahrensschritte ein sicheres Aufschließen der Pilzzellen mit daraufhin erfolgender vollständiger Freigabe der Pilz-DNA möglich ist, so daß die Pilz-DNA nunmehr frei in Lösung ist und von den Zellbruchstücken der Pilzzellen isoliert werden kann.

25 [0031] Dabei ist es bevorzugt, wenn in diesem Zusammenhang der Schritt b2) folgende Schritte umfaßt:

- Proteinpräzipitation mit 5 M Kaliumazetat, und
- DNA-Präzipitation des Überstandes in eiskaltem Isopropanol.

30 [0032] Diese Verfahrensschritte sind sehr einfach durchzuführen, zunächst wird durch Zugabe von Kaliumazetat das Protein herausgefällt, dann der Überstand abgenommen und mit eiskaltem Isopropanol versetzt, so daß die DNA ausfällt. Diese ausgefallene DNA kann dann für die weiteren Verfahrensschritte herangezogen werden, also zum Nachweis und zur Identifizierung einer Pilzinfektion dienen.

35 [0033] Bei dem beschriebenen Verfahren ist also zusammengefaßt als erstes von Vorteil, daß die Pilzspezies sozusagen an Hand ihrer DNA allgemein nachgewiesen und dann speziell identifiziert werden kann. Die Pilz-DNA wird dabei nicht direkt aus dem Vollblut extrahiert, sondern zunächst erfolgt eine Trennung der Pilzzellen von zellulärer DNA, um die Sensitivität und Spezifität des Nachweises zu erhöhen. Mit anderen Worten, wenn nur sehr wenige Pilzzellen in dem Vollblut vorhanden sind, so könnte die daraus extrahierte sehr geringe Pilz-DNA-Menge ggf. vor dem Hintergrund der in sehr hoher Konzentration vorliegenden zellulären DNA nicht nachgewiesen werden, so daß die erwähnte Trennung hier große Vorteile bezüglich der Sensitivität bringt.

40 [0034] Ein weiterer Vorteil bei dem neuen Verfahren liegt darin, daß auch phagozytierte Pilzzellen für den Nachweis zur Verfügung stehen, da zunächst die Blutzellen des Vollblutes aufgeschlossen werden, ohne daß dabei die Pilzzellen, seien sie frei in Lösung oder in phagozytiertem Zustand, beschädigt werden. Erst nach Abtrennung der Pilzzellen von der zellulären DNA und den verbleibenden Zelltrümmern der Blutzellen werden dann die Pilzzellen aufgeschlossen. Das hierzu verwendete Verfahren ist in der Lage, trotz der sehr komplexen Pilzzellwände für einen vollständigen Aufschluß zu sorgen, ohne daß dabei die Pilz-DNA zerstört wird.

45 [0035] Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist ebenfalls ein Kit zur Durchführung des oben beschriebenen Verfahrens. Ein derartiges Kit kann eine Zusammenstellung sämtlicher Stammlösungen enthalten, wie sie für die genannten Verfahrensschritte im einzelnen benötigt werden. Es ist jedoch auch möglich, in diesem Kit nur die nicht üblicherweise in einem Labor vorrätigen Stammlösungen vorzusehen, so daß bspw. auf die Tris-Puffer etc. verzichtet werden kann, aber zumindest die Proteinase K und die Zymolyase in dem Kit vorhanden sind.

50 [0036] In den Beispielen 6 bis 9 ist beschrieben, wie zunächst nachgewiesen wird, ob in dem Präzipitat überhaupt Pilz-DNA vorhanden ist, woraufhin dann das Präzipitat noch einzelnen Pilzspezies zugeordnet werden muß. Dabei wird ausgenutzt, daß die im Sequenzprotokoll unter SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 angegebenen DNA-Sequenzen spezifisch an Bindungsstellen auf dem Pilz-Gen für die 18 ssu-rRNA vieler Pilzstämme und -spezies binden und als Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion Verstärkungsprodukte mit einer Länge von ca. 500 Basenpaaren erzeugen. Diese Verstärkungsprodukte können dann im Rahmen einer sequentiellen Hybridisierung bestimmten Pilzspezies zugeordnet werden, wobei als Hybridisierungssonden die im Sequenzprotokoll angegebenen Nukleotidsequenzen SEQ ID-No:

3 bis SEQ ID-No: 8 verwendet werden, die Spezies-spezifische Sonden sind.

[0037] Selbstverständlich kann die Pilz-DNA auch mit anderen z.B. molekularbiologischen Methoden nachgewiesen und einzelnen Pilzspezies zugeordnet werden, die PCR mit den spezifischen Primern sowie die anschließende sequentielle Hybridisierung stellen jedoch sehr funktionssichere, einfach zu handhabende Verfahren dar.

5 [0038] Weitere Vorteile ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung.

[0039] Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den jeweils angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

10 [0040] Beispiele für die Durchführung der einzelnen Verfahrensschritte sowie die Anwendung des Verfahrens im Rahmen eines klinischen Untersuchungsprogrammes sind in der folgenden Beschreibung angegeben.

[0041] Ein besonderer Vorteil des neuen Verfahrens liegt darin, daß es mit Vollblut durchgeführt wird, daß also z.B. keine Biopsie erforderlich ist oder noch herzustellendes Serum verwendet wird. Mit dem Vollblut wird zunächst eine Trennung der Pilzzellen von zellulärer DNA vorgenommen. Dies ist erforderlich, damit die ggf. nur in geringer Menge vorliegende Pilz-DNA nicht vor dem Hintergrund der in sehr viel höherer Konzentration vorhandenen zellulären DNA 15 nachgewiesen werden muß. Dadurch wird also die Spezifität des Nachweisverfahrens erhöht. Zu diesem Zweck werden als erstes die roten Blutkörperchen durch osmotische Hämolyse lysiert und dann die weißen Blutkörperchen enzymatisch aufgeschlossen. Diese beiden Verfahrensschritte sind so ausgewählt, daß durch sie die Pilzzellen selbst noch nicht beschädigt werden und daß ggf. phagozytierte Pilzzellen unbeschädigt wieder freigesetzt werden, so daß auch sie für den weiteren Nachweis zur Verfügung stehen.

20 Beispiel 1: Lysis roter Blutkörperchen durch osmotische Hämolyse.

[0042] Die Lysis der roten Blutkörperchen erfolgt mit Hilfe einer hypotonen Lösung. Dazu wird folgender Puffer mit folgenden Endkonzentrationen verwendet:

25

Tris pH 7,6 10 mM

MgCl₂ 5 mM

30

NaCl 10 mM

35 [0043] Die Lösung wird für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und danach zentrifugiert.

[0044] Für diesen ersten Schritt ist eine Menge von 3 ml Vollblut ausreichend.

Beispiel 2: Enzymatisches Aufschließen weißer Blutkörperchen

40 [0045] Die weißen Blutkörperchen, die ggf. Pilzzellen enthalten, werden vorsichtig aufgebrochen, indem die Zellen mit Proteinase K (200 µg/ml) der Firma Boehringer, Mannheim in folgendem Puffer mit den angegebenen Endkonzentrationen enzymatisch angedaut werden, in dem das Pellet aus Beispiel 1 aufgenommen wird:

45

Tris pH 7,6 10 mM

EDTA pH 8,0 10 mM

50

NaCl 50 mM

SDS 0,2 %

Proteinase K 200 µg/ml

55

[0046] Dieser Puffer wird für zwei Stunden bei 65 C inkubiert.

Beispiel 3: Trennung überwiegend intakter Pilzzellen vor allem von zellulärer DNA

5 [0047] Nachdem wie in den Beispielen 1 und 2 angegeben die Blutzellen aufgeschlossen wurden, so daß die zelluläre DNA freigegeben wurde, erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 5000 Umdrehungen/min, der zu einem erheblichen Verlust an zellulärer DNA führt, die bei dieser Zentrifugationsgeschwindigkeit nicht sedimentiert.

10 [0048] Im Sediment befinden sich jetzt vollständig die freien oder freigesetzten Pilzzellen, die für die weitere Verarbeitung in einem Puffer (Aqua bidest) aufgenommen werden.

Beispiel 4: Aufschließen der Pilzzellen

10 [0049] Als nächstes werden die Pilzzellen alkalisch lysiert und enzymatisch behandelt, um die Pilz-DNA freizusetzen.

[0050] Dazu erfolgt zunächst eine Alkaliolyse mit 200 ml 50 mM NaOH für 10 min bei 95°C.

[0051] Daraufhin erfolgt ein Neutralisationsschritt mit 1 M Tris-HCl pH 7,0.

[0052] Als nächstes werden 500 µl Zymolyase von Sigma (300 µg/ml) zugegeben und die Lösung für 60 min bei 37°C inkubiert, um die Pilzzellen enzymatisch aufzuschließen.

15 [0053] Daraufhin werden 500 µl Tris/EDTA und 50 µl 10%iger SDS Lösung zugegeben und das Gemisch bei 65°C für 20 min inkubiert, um das Protein zu denaturieren.

Beispiel 5: Isolation der Pilz-DNA

20 [0054] In der nunmehr vorliegenden Lösung befinden sich Trümmer der Pilzzellen sowie freie Pilz-DNA, die nun isoliert werden muß.

[0055] Hierzu erfolgt zunächst eine Proteinpräzipitation mit 5 M Kaliumazetat, woraufhin der Überstand abgenommen und die DNA dann durch Zugabe von eiskaltem Isopropanol ausgefällt wird. Dieses Fällungsprodukt wird dann für die weiteren Verfahrensschritte verwendet.

25 [0056] Durch die in den Beispielen 1 - 5 angegebenen Verfahrensschritte ist es also möglich, aus Vollblut hoch-selektiv Pilz-DNA zu extrahieren, die nun als Präzipitat vorliegt und nur gering mit zellulärer DNA verunreinigt ist, wodurch der jetzt erfolgende Nachweis sehr sensitiv und hochspezifisch erfolgen kann.

30 Beispiel 6: Amplifikation eines pilzspezifischen DNA-Segmentes

35 [0057] In diesem Verfahrensschritt soll zunächst nachgewiesen werden, ob in dem Präzipitat aus dem Verfahrensschritt in Beispiel 5 überhaupt Pilz-DNA vorhanden ist. Dabei wird ausgenutzt, daß die im Sequenzprotokoll unter SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 angegebenen DNA-Sequenzen spezifisch an Bindungsstellen auf dem Pilz-Gen für die 18ssu-rRNA vieler Pilzstämme und -spezies binden.

[0058] Der Erfinder der vorliegenden Anmeldung hat nämlich erkannt, daß dieses Pilz-Gen bei den verschiedenen Pilz-Stämmen und -Gattungen ein derartiges Sequenzsegment aufweist, das einerseits von zwei Bindungsregionen für Primer flankiert wird, die für alle Pilz-Stämmen und -Gattungen identisch sind, daß aber andererseits die Sequenz dieses Segmentes für die verschiedenen Pilz-Stämmen und -Gattungen so verschieden ist, daß sie gleichzeitig zum Nachweis der einzelnen Pilzspezies und -Gattungen verwendet werden kann.

40 [0059] Die DNA-Sequenz SEQ ID-No: 1 bindet dabei an den sense-Strang, während die DNA-Sequenz SEQ ID-No: 2 an den anti-sense-Strang bindet, wobei der Abstand zwischen den beiden Bindungsstellen ca. 500 Basenpaare beträgt. Diese beiden DNA-Sequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 eignen sich damit als Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR), in der folglich Verstärkungsprodukte (Amplicon) mit einer Länge von ca. 500 Basenpaaren erzeugt werden.

45 [0060] In der nachfolgenden Tabelle 1 ist die Lage der Primer und die Länge des jeweiligen Amplicons angegeben.

50

55

Tabelle 1: Von Pilz-Pathogenen erhaltene Amplicons

5	Pilzspezies	Bindungsstellen der Primer		Länge des Amplicons
		Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	
10	C. albicans	bp544-563	bp1033-1014	bp490
	C. glabrata	bp546-565	bp1047-1028	bp502
	C. krusei	bp535-554	bp1016-997	bp482
15	C. tropicalis	bp544-563	bp1030-1011	bp487
	C. parapsilosis	bp544-563	bp1033-1014	bp490
	A. fumigatus	bp544-563	bp1046-1027	bp503
20	A. niger	bp483-502	bp986 - 967	bp503
	A. flavus	bp483-502	bp985 - 966	bp502
	A. terreus	bp481-500	bp984 - 965	bp503
25	A. nidulans	bp481-500	bp984 - 965	bp503

30 [0061] Durch diese beiden Primer SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 lassen sich also für alle relevanten Pilzspezies der Gattungen Candida und Aspergillus durch das PCR-Verfahren Amplicons von ca. 500 Basenpaaren in ausreichender Menge herstellen.

[0062] Die PCR-Bedingungen sind dabei die folgenden:

35 Puffer (50 µl):
 10 mM Tris pH 9,6
 50 mM NaCl
 40 10 mM MgCl₂,
 0,2 mg/ml BSA
 Polymerase
 45 je 0,5 mM Nukleotide
 je 100 pM Primer
 Anfängliche Denaturierung: 3 min bei 94 C
 Zyklus-Denaturierung: 0,5 min bei 94 C
 50 Annealing: 1 min bei 62 C

Extension: 2 min bei 72 C

5

Terminale Extension:

5 min bei 72 C

Zykluszahl: 34

10

[0063] Die hohe Magnesiumkonzentration im Puffer sorgt für eine hohe Spezifität der Polymerase, die mit 72 C im Extensions-Schritt bei ihrem Temperaturoptimum arbeiten kann.

[0064] Mit diesen Primern konnten insgesamt 40 Stämme von *Candida albicans*, 10 Stämme von *Candida tropicalis*, 6 Stämme von *Candida parapsilosis*, 11 Stämme von *Candida glabrata*, 8 Stämme von *Candida krusei*, 8 Stämme von *Aspergillus fumigatus*, 6 Stämme von *Aspergillus flavus*, 5 Stämme von *Aspergillus terreus*, 7 Stämme von *Aspergillus niger*, 5 Stämme von *Aspergillus nidulans* und 3 Stämme von *Aspergillus versicolor* erfolgreich amplifiziert werden.

20 Beispiel 7: Nachweis der Amplifikationsprodukte aus Beispiel 6

[0065] Im nächsten Schritt soll jetzt nachgewiesen werden, ob bei der PCR-Reaktion aus Beispiel 6 auch tatsächlich DNA-Segmente mit einer Länge von ca. 500 Basenpaaren hochverstärkt wurden. Diese Detektion der pilzspezifischen DNA-Segmente erfolgt durch Ethidiumbromid-Färbung der spezifischen Bande in einem 2%igen Agarose-Gel.

25 [0066] Ist hier die spezifische Bande zu erkennen, so kann von einer Pilzinfektion ausgegangen werden, da die Primer SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 an alle oben erwähnten Pilzstämme binden. Sollte also durch die Verfahrensschritte aus den Beispielen 1 - 5 Pilz-DNA extrahiert worden sein, so wird sie durch den PCR-Schritt des Beispiels 6 so weit hochverstärkt, daß sie hier durch Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen werden kann.

30 Beispiel 8: Zuordnung der Amplifikationsprodukte aus Beispiel 6 zu einzelnen Pilzspezies

[0067] Für eine spezifische Therapie ist es jetzt noch erforderlich, die im Schritt 7 bereits nachgewiesene Pilzinfektion genauer zu spezifizieren. Hier zeigt sich jetzt ein weiterer Vorteil des PCR-Schrittes aus Beispiel 6. Dort wurde nämlich so viel pilzspezifisches DNA-Segment erzeugt, daß jetzt weitere Nachweisverfahren zur Bestimmung der Pilzspezies möglich sind.

[0068] Hierzu werden die im Sequenzprotokoll angegebenen Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 bis SEQ ID-No: 8 herangezogen, die als Spezies-spezifische Sonden dienen, die mit einem Sequenzabschnitt des in Beispiel 6 erzeugten DNA-Segmentes spezifisch hybridisieren.

[0069] Es wurde gefunden, daß die Sonde SEQ ID-No: 3 mit *Candida albicans*, SEQ ID-No: 4 mit *Candida glabrata*, SEQ ID-No: 5 mit *Candida krusei*, SEQ ID-No: 6 mit *Candida tropicalis*, SEQ ID-No: 7 mit *Candida parapsilosis* und

40 SEQ ID-No: 5 mit *Candida* Nusel, SEQ ID-No: 6 mit *Candida* tropicalis, SEQ ID-No: 7 mit *Candida* parapsilosis
SEQ ID-No: 8 mit *Aspergillus* fumigatus, *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. nidulans* und *A. terreus* hybridisieren. Die
Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 8 ist also eine allgemeine *Aspergillus*-Sonde, während die Nucleotidsequenzen SEQ
ID-No: 3 - SEQ ID-No: 5 Pilzspezies der Gattung *Candida* voneinander unterscheiden können.

[0070] Um die erfolgreiche Hybridisierung nachzuweisen zu können, werden die Sonden mit dem Transferase-Kit der Firma Boehringer Mannheim mit Digoxigenin markiert, wobei der Nachweis nach dem Southern Blot-Verfahren mit der übli-

48 Boeninger, Mainz/19.11.2013/19.11.2013, Wasser der Wachstums - Farbreaktion erfolgt.

[0071] Mit Hilfe dieser Sonden erfolgt eine sequentielle Hybridisierung, die nach der Häufigkeit der einzelnen Pilzspezies sortiert.

50 zies gestaffelt ist, so daß zunächst mit SEQ ID-No: 3 (*C. albicans*), dann mit SEQ ID-No: 8 (*Aspergillus*), SEQ ID-No: 6 (*C. tropicalis*), SEQ ID-No: 7 (*C. parapsilosis*), SEQ ID-No: 4 (*C. glabrata*) und schließlich mit SEQ ID-No: 5 (*C. krusei*) hybridisiert wird.

[0072] Auf diese Weise ist es also möglich, an Hand der im Schrittbeispiel 6 erzeugten Amplifikationsprodukte durch sequentielles Hybridisieren die Pilzspezies zu identifizieren und anschließend eine gezielte Therapie einzuleiten.

Beispiel 9: Nachweis ausgesäter Pilzzellen in Blut

55 [0073] Mit Hilfe der spezifischen Amplifikation und sequentiellen Hybridisierung gelang es, Pilzspezies mit einer Sensitivität von 1 - 3 Pilzzellen reproduzierbar nachzuweisen. Durch Aussaat von Pilzspezies in Blutproben konnte nachgewiesen werden, daß das obige Verfahren eine Sensitivität von einer sog. CFU (colony forming unit)/ml-Blut erreicht.

Diese Nachweisgrenze liegt weit unterhalb derjenigen, die bei einer klinisch relevanten Pilzaussaat in Blut erwartet werden kann.

Beispiel 10: Klinisches Untersuchungsprogramm

5

[0074] In einem groß angelegten klinischen Untersuchungsprogramm konnte eine hohe Spezifität des neuen Verfahrens bei der Analyse von 165 Blutproben von 65 gesunden Probanden gezeigt werden. Alle 165 Blutproben sind negativ geblieben.

10

[0075] 94 immunsupprimierte Patienten mit unklarem Fieber wurden daraufhin auf die Präsenz einer Pilzinfektion untersucht. Von 69 Patienten, bei denen keine invasive Pilzinfektion vorlag, waren weit über 200 Blutproben (bis auf eine Ausnahme) ebenfalls negativ.

[0076] Dagegen konnten alle 25 Patienten mit invasiver Pilzinfektion bereits innerhalb der ersten Woche als positiv identifiziert werden. Bei allen Patienten gelang darüber hinaus die Zuordnung zu dem verursachenden Pilzerreger.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Eberhard-Karls-Universitaet Tuebingen,
Universitaetsklinikum
(B) STRASSE: Geissweg 3
(C) ORT: Tuebingen
(E) LAND: Germany
(F) POSTLEITZAHL: D-72076

10

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Extraktion von Pilzzellen aus
klinischem Material

15 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Witte, Weller, Gahlert, Otten & Steil
(B) STRASSE: Rotebuehlstrasse 121
(C) ORT: Stuttgart
(E) LAND: Deutschland
20 (F) POSTLEITZAHL: D-70178

20

25 (v) COMPUTER-LESBARE PASSUNG:

(A) DATENTRAEGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

25

(vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: 98103296.4
(B) ANMELDEDATUM: 25.02.1998

30

(vii) DATEN FRUEHERER ANMELDUNGEN:

(A) ANMELDENUMMER: DE 195 30 332.6
(B) ANMELDEDATUM: 17.08.1995
(A) ANMELDENUMMER: DE 195 30 333.4
(B) ANMELDEDATUM: 17.08.1995
35 (A) ANMELDENUMMER: 195 30 336.9
(B) ANMELDEDATUM: 17.08.1995
(A) ANMELDENUMMER: 96 929 253.1 (WO 97/07238)
(B) ANMELDEDATUM: 13.08.1996

35

40 (viii) INFORMATION ZUM VERTRETER:

(A) NAME: Dr. Hajo Otten
(B) VERTRETERNUMMER: 0075070.3
(C) ANWALTSAKTE: 5402P155EP

40

45 (ix) INFORMATION ZUR TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: 0711-66 669-0
(B) TELEFAX: 0711-66 669-99

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LAENGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleinsaeure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

55

(iii) HYPOTHETISCH: JA

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATTGGAGGGC AAGTCTGGTG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsaeure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15

(iii) HYPOTHETISCH: JA

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CCGATCCCTA GTCGGCATAG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsaeure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(iii) HYPOTHETISCH: JA

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TCTGGGTAGC CATTATGGC GAACCAGGAC

30

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

40

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsaeure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(iii) HYPOTHETISCH: JA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TTCTGGCTAA CCCCAAGTCC TTGTGGCTTG

30

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsaeure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

55

(D) TOPOLOGIE: linear

5 (iii) HYPOTHETISCH: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

10 GTCTTTCCCTT CTGGCTAGCC TCGGGCGAAC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsaeure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (iii) HYPOTHETISCH: JA

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

25 GTTGGCCGGT CCATCTTTCT GATGCGTACT

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

30 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsaeure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(iii) HYPOTHETISCH: JA

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

40 TTTCCCTTCTG GCTAGCCTTT TTGGCGAACCC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsaeure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45 (iii) HYPOTHETISCH: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

50 CATGGCCTTC ACTGGCTGTG GGGGAAACCA

30

55 Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweisen von Pilzzellen in klinischem Material unter Extrahieren von Pilz-DNA aus Vollblut, mit den Schritten:

5 a) Isolation überwiegend intakter Pilzzellen aus dem Vollblut, und
b) Extrahieren von DNA aus den isolierten Pilzzellen durch
b1) Aufschließen der isolierten Pilzzellen, und
b2) Isolation der Pilz-DNA,
dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt a) die weiteren Schritte umfaßt:
a1) Aufschließen der im Vollblut befindlichen Blutzellen; und
a2) Isolation überwiegend intakter Pilzzellen von zellulärer DNA.

10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt a) die weiteren Schritte umfaßt:
a1.1) Lysis der roten Blutkörperchen durch osmotische Hämolysen;
a1.2) enzymatisches Aufschließen der weißen Blutkörperchen; und
a2.1) Zentrifugation des so behandelten Vollblutes und Verwendung des Pellet in den nächsten Verfahrensschritten.

15 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt a1.1) die Lysis der roten Blutkörperchen mit Hilfe einer hypotonen Lösung und einem Detergent erfolgt, vorzugsweise mit einer Endkonzentration von 10 mM Tris pH 7,6, 5 mM MgCl₂ und 10 mM NaCl.

20 4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt a1.2) das enzymatische Aufschließen der weißen Blutkörperchen in einer Lösung mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml Proteinase K, 10 mM Tris pH 7,6, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl und 0,2 % SDS erfolgt.

25 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung für 100 - 140 min, vorzugsweise 120 min bei 60-70°C, vorzugsweise bei 65°C inkubiert wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt b1) den weiteren Schritt umfaßt:
b1.1) Alkalisches Lysieren und enzymatische Behandlung der Pilzzellen.

30 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt b1.1) folgende Schritte umfaßt:
- Inkubieren der im Pellet aus Schritt a2.1) befindlichen Pilzzellen bei 90-95°C, vorzugsweise 95°C für 5-15 min, vorzugsweise 10 min, in einer Lösung mit 50 mM NaOH, und
- Neutralisation mit 1 M Tris-HCl pH 7,0,
- enzymatische Behandlung mit Zymolase für 50-70 min, vorzugsweise 60 min bei 30-40°C, vorzugsweise 37°C,
- Proteindenaturierung durch Inkubation mit Tris/EDTA bei 60-70°C, vorzugsweise 65°C für 10-30 min, vorzugsweise 20 min.

40 8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt b2) folgende Schritte umfaßt:
- Proteinpräzipitation mit 5 M Kaliumazetat, und
- DNA-Präzipitation des Überstandes in eiskaltem Isopropanol.

45 9. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 8.

50

55